

THESIS

Munich

1964

# Nachweis der Hautresorption von Butazolidin-Salben beim Menschen

LANE MEDICAL LIBRARY  
STANFORD UNIVERSITY  
300 PASTEUR DRIVE  
PALO ALTO, CALIF.

von  
ERNST  BRUSIS

München 1964



Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität

München

Direktor: Professor Dr. W. Seitz

Nachweis der Hautresorption  
von Butazolidin-Salben beim Menschen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin  
verfasst und einer Hohen Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Ernst Brusis

aus

Krailling

1964

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

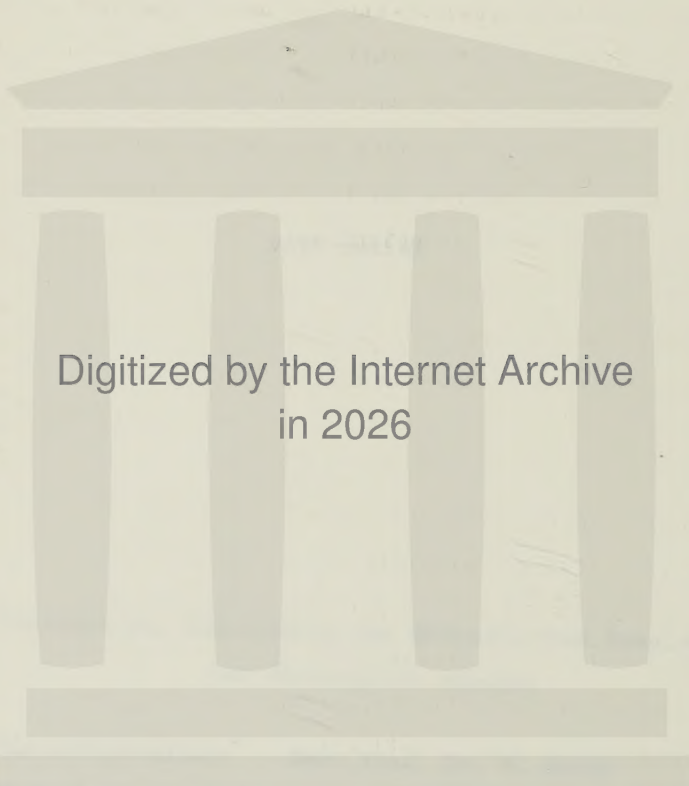
Berichterstatter: Herr Prof. Dr. W. Seitz

Mitberichterstatter: Herr Prof. Dr. R. Bachmann

Dekan: Herr Prof. Dr. R. Bachmann

Tag der mündlichen Prüfung: 7. Januar 1964

Meiner Frau



Digitized by the Internet Archive  
in 2026

## Inhaltsverzeichnis

|                                                | Seite |
|------------------------------------------------|-------|
| Problematik                                    | 5     |
| Eigene Untersuchungen                          | 7     |
| Methodik                                       | 7     |
| Versuchsreihen                                 | 9     |
| Statistische Auswertung der Versuchsergebnisse | 16    |
| Diskussion                                     | 37    |
| Zusammenfassung                                | 41    |
| Literaturverzeichnis                           | 42    |



## Problematik

In der vorliegenden Arbeit soll der Nachweis einer percutanen Resorption von Phenylbutazon, appliziert in Salbenform, beim Menschen erbracht werden. Zum Nachweis der Butazolidin-Resorption diente methodisch der hemmende Einfluß auf die durch Hyaluronidase geförderte Farbstoffausbreitung im Spreading-Test. M a t h i e s und Mitarbeiter (1 - 6) konnten eine Hemmwirkung auf die Hyaluronidase im Spreading-Test bei parenteraler Applikation von Phenylbutazon wie auch von Salizylaten und Glukokortikoiden an Ratten über Katecholamin-Ausschüttung des Nebennierenmarkes nachweisen. Ebenso konnte M a t h i e s durch Untersuchungen am Menschen zeigen, daß auch hier der gleiche Wirkungsmechanismus bei intramuskulärer Applikation von Butazolidin über Ausschüttung von Katecholaminen und damit Hemmung des Farbstoff-Spreading-Testes vorliegt (7). In früheren Arbeiten konnten M a t h i e s und Mitarbeiter eine percutane Butazolidin- sowie auch Salizylat-Resorption nach Salben- und Badeapplikation im Tierversuch beweisen (8 - 10). Die Versuche an der Ratte wurden mit operativer Trennung der Applikationsstelle, der Brusthaut, und der Meßstelle, der Bauchhaut, durchgeführt, um die Allgemeinwirkung durch die Versuchssubstanz nach erfolgter Resorption eindeutig zu demonstrieren. Die bei der Ratte nachgewiesene Phenylbutazon-Resorption durch die Haut war aber noch nicht mit der gleichen Wirkung beim Menschen gleichzusetzen. In unveröffentlichten Versuchen konnte eine eindeutige Hyaluronidase-Hemmwirkung bei 2,5 g einer

5 %igen Butazolidin-Salbe pro Versuchsperson nicht statistisch gesichert werden, was sicherlich durch die zu geringe Menge der applizierten Wirksubstanz pro kg Körpergewicht bedingt war, auch wenn man die applizierte Menge als völlig resorbiert betrachten will. In Versuchen mit Ratten bei intraperitonealer Applikation von Butazolidin hat sich nämlich eine noch hyaluronidasehemmende Wirkung zwischen 10 bis 50 mg Wirksubstanz pro kg Körpergewicht als untere Grenze der wirksamen Dosierung ergeben, wenn man auch diese Richtdosis nicht ohne weiteres vom Tier auf den Menschen übertragen darf. Außerdem hat sich schon bei früheren Arbeiten herausgestellt, daß das im Tierversuch als Farbstoff verwandte Evans-Blau für Untersuchungen am Menschen wegen der zu langen Verweildauer in der Haut ungeeignet ist (11), der Patentblau VF-Farbstoff aber, der beim Menschen verwandt wurde, nicht so deutliche Differenzen zwischen Farbstoff- und Farbstoffhyaluronidase-Quaddel ergibt.

## Eigene Untersuchungen

### Methodik

In den folgenden Versuchen wurde den Probanden je 30 g Butazolidin-Salbe verschiedener Konzentration appliziert, was bei der 20 %igen Salbe 6 g Butazolidin pro Versuchsperson, d.h. bei einem durchschnittlichen Körpergewicht von 75 kg 80 mg pro kg Körpergewicht, bei der 5 %igen Salbe 1,5 g Butazolidin, d.h. 20 mg pro kg Körpergewicht, entspricht.

Die experimentellen Untersuchungen in der vorgelegten Arbeit wurden an männlichen und weiblichen Versuchspersonen im Alter zwischen 20 und 30 Jahren mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von 75 kg durchgeführt. Als Grundlage diente der sogenannte Spreading-Test, der eine Messung der Hyaluronidase-Aktivität und deren Hemmung zuläßt.

Den jeweils 4 Probanden einer Versuchsreihe wurden je 30 g einer Butazolidin-Salbe einer jeweils verschiedenen Konzentration auf die Brust- und seitliche Thoraxhaut sowie an die Streckseiten der Extremitäten verabfolgt. Die Applikation erfolgte am liegenden Probanden. Es wurde vor und zu verschiedenen Zeiten nach der Applikation der Prüfsubstanz je eine Farbstoff- und eine Farbstoffhyaluronidase-Quaddel streng intracutan in die Bauchhaut der Versuchspersonen gesetzt und die Farbstoffausbreitung nach 10 Minuten durch Übertragung

der Konturen auf einen Filmstreifen und anschließende planimetrische Ausmessung ermittelt. Zum Setzen der Farbstoff-Quaddeln diente eine 0,1 %ige Patentblau VF-Lösung in physiologischer NaCl-Lösung, für die Farbstoffhyaluronidase-Quaddel die gleiche Lösung mit 75 I.E. einer hochgereinigten Testes-Hyaluronidase pro 1 ml. Für jede Quaddel wurden 0,1 ml der jeweiligen Lösungen verwendet, die mit Tuberkulin-Spritzen und dünnen Kanülen (Kanüle Nr. 20) streng intracutan gespritzt wurden. Für Quaddeln, die nicht streng intracutan zu liegen schienen, wurde in unmittelbarer Nähe eine Ersatzquaddel gesetzt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Resorption durch die Haut von verschiedenen prozentigen Butazolidin-Salben durch deren hemmende Wirkung auf die Hyaluronidase-Aktivität geprüft. Dabei ergab sich folgende Versuchsanordnung: Ein Leerversuch mit einem Quaddelpaar orientierte über die Hyaluronidase-Aktivität ohne Einwirkung hemmender Substanzen. Daran anschließend wurden jeweils 30 g der zu prüfenden Butazolidin-Salbe auf Brust- und seitliche Thoraxhaut sowie den Streckseiten der Extremitäten aufgetragen. Auf der Bauchhaut jedes Probanden wurde dann in Abständen von je 30 Minuten bis insgesamt 240 Minuten ein Quaddelpaar gesetzt. Damit wurde also die Hemmung nach 30', 60', 90', 120', 150', 180', 210' und 240' geprüft.

## Versuchsreihen

### 1. Versuchsreihe

Nach der vorher beschriebenen Methodik wurde die Wirkungsweise einer 20 %igen Butazolidin-Salbe R 1802 untersucht. Salbentyp: Öl-in-Wasser-Emulsions-Salbengrundlage. Die Wirksubstanz ist in Form ihres Natrium-Glyzerin-Salzes zum grossen Teil in der Ölphase der Emulsion suspendiert und zum kleinen Teil in der Wasserphase gelöst. pH = 8,6. Bei 4 Probanden wurden Quaddelpaare in der vorher aufgeführten Zeitfolge nach Auftragen der Salbe gesetzt. Die Ergebnisse sind aus Tabelle 1 zu ersehen. Die Zahlen geben die planimetrierte Farbstoff-Fläche in  $\text{mm}^2$  an.

### 2. Versuchsreihe

In Versuchsreihe 2 wurden 4 Probanden mit 5 %iger Butazolidin-Salbe R 2070 getestet. Salbentyp: Öl-in-Wasser-Suspensions-Emulsions-Salbengrundlage. pH = 6,8. Die Wirksubstanz ist in dieser Grundlage in feinen Kristallen suspendiert. Ergebnisse siehe Tabelle 2.

### 3. Versuchsreihe

4 Probanden wurden in Versuchsreihe 3 mit einer 5 %igen Butazolidin-Salbe R 2131 getestet. Salbentyp: Öl-in-Wasser-

Emulsions-Salbengrundlage. pH = 5,5. Die Wirksubstanz ist in der lipophilen Phase der Emulsion gelöst. Ergebnisse in Tabelle 3.

#### 4. Versuchsreihe

Als Salbe diente ebenfalls eine 5 %ige Butazolidin-Salbe R 2189. Salbentyp: Es handelt sich hierbei um die in Frankreich kommerzialisierte Midi-Salbe, die uns zur Vergleichsprüfung zur Verfügung gestellt wurde. Genaueres ist uns daher über den Salbentyp nicht bekannt. Ergebnisse siehe Tabelle 4.

#### 5. Versuchsreihe

Bei gleicher Versuchsanordnung wie in den vorhergehenden Versuchen wurde hier die Salbengrundlage des Präparates R 2070 im Placebo-Versuch an 4 Probanden getestet. Salbentyp: Öl-in-Wasser-Suspensions-Emulsions-Salbengrundlage. pH = 6,8. Ergebnisse in Tabelle 5.

#### Zeichenerklärung zu den Tabellen

Zeit = Zeit in Minuten nach Auftragen der Salbe

F = Farbstoffquaddel ohne Hyaluronidase

FH = Farbstoffquaddel mit Hyaluronidase

L = Leerversuch vor Auftragen der Salbe

Tabelle 1

(Versuchsreihe 1)

R 1802

Versuchsperson

1.

2.

3.

4.

| Zeit | F  | FH  | F   | FH  | F   | FH  | F   | FH  |
|------|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| L    | 87 | 100 | 100 | 120 | 100 | 120 | 105 | 123 |
| 30'  | 90 | 93  | 98  | 86  | 95  | 90  | 100 | 74  |
| 60'  | 86 | 84  | 99  | 79  | 93  | 83  | 102 | 63  |
| 90'  | 84 | 73  | 90  | 65  | 96  | 74  | 98  | 62  |
| 120' | 87 | 65  | 103 | 59  | 91  | 56  | 98  | 56  |
| 150' | 80 | 60  | 97  | 53  | 94  | 63  | 96  | 78  |
| 180' | 84 | 74  | 95  | 68  | 96  | 77  | 100 | 83  |
| 210' | 85 | 82  | 96  | 77  | 100 | 79  | 103 | 88  |
| 240' | 90 | 96  | 105 | 93  | 102 | 108 | 108 | 109 |

Tabelle 2

(Versuchsreihe 2)

R 2070

Versuchsperson

1.

2.

3.

4.

Zeit

F

PH

F

PH

F

PH

F

PH

L

30'

60'

90'

120'

150'

180'

210'

240'

128

115

96

94

68

83

85

96

108

110

109

112

107

106

92

96

98

110

123

119

108

103

70

73

85

83

97

117

118

100

73

71

70

64

83

89

110

110

105

82

85

96

108

120

85

72

74

69

66

72

78

94

Tabelle 3

(Versuchsreihe 3)

R 2131

Versuchsperson

1.

2.

3.

4.

| Zeit | F   | PH  | F   | PH  | F   | PH  | F   | PH  |
|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| L    | 120 | 150 | 100 | 120 | 110 | 130 | 120 | 140 |
| 30'  | 115 | 122 | 98  | 110 | 103 | 116 | 112 | 100 |
| 60'  | 110 | 109 | 100 | 104 | 94  | 100 | 100 | 95  |
| 90'  | 120 | 85  | 104 | 96  | 96  | 90  | 92  | 82  |
| 120' | 115 | 100 | 100 | 101 | 105 | 93  | 113 | 88  |
| 150' | 113 | 112 | 102 | 103 | 108 | 98  | 115 | 90  |
| 180' | 124 | 118 | 103 | 110 | 115 | 100 | 109 | 98  |
| 210' | 120 | 133 | 105 | 112 | 110 | 120 | 112 | 100 |
| 240' | 123 | 144 | 106 | 115 | 112 | 127 | 117 | 120 |

Tabelle 4  
(Versuchsreihe 4)

R 2189

Versuchsperson

1.

2.

3.

4.

Zeit

P

PH

P

PH

P

PH

P

PH

L

30'

60'

90'

120'

150'

180'

210'

240'

|  |     |     |     |     |     |     |     |     |
|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|  | 120 | 135 | 130 | 145 | 127 | 140 | 130 | 150 |
|  | 110 | 120 | 128 | 115 | 124 | 130 | 125 | 140 |
|  | 110 | 110 | 125 | 110 | 125 | 105 | 123 | 132 |
|  | 110 | 85  | 120 | 100 | 128 | 100 | 128 | 80  |
|  | 117 | 90  | 110 | 90  | 125 | 106 | 126 | 87  |
|  | 120 | 95  | 126 | 113 | 130 | 120 | 126 | 88  |
|  | 117 | 100 | 124 | 132 | 138 | 130 | 130 | 110 |
|  | 122 | 114 | 130 | 136 | 135 | 133 | 132 | 125 |
|  | 125 | 130 | 135 | 142 | 140 | 140 | 135 | 130 |

Tabelle 5

(Versuchsreihe 5)

| <u>Placebo</u> |      | 1.  |     | 2.  |     | 3.  |     | 4.  |     |
|----------------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Versuchsperson | Zeit | F   | PH  | F   | PH  | F   | PH  | F   | PH  |
| I.             |      | 99  | 130 | 100 | 126 | 106 | 125 | 103 | 120 |
| 30'            |      | 90  | 125 | 96  | 118 | 100 | 124 | 106 | 125 |
| 60'            |      | 100 | 124 | 103 | 119 | 110 | 128 | 111 | 126 |
| 90'            |      | 95  | 120 | 98  | 113 | 108 | 123 | 108 | 125 |
| 120'           |      | 98  | 121 | 95  | 110 | 113 | 118 | 104 | 127 |
| 150'           |      | 96  | 118 | 100 | 110 | 111 | 116 | 110 | 128 |
| 180'           |      | 95  | 124 | 94  | 110 | 110 | 124 | 105 | 125 |
| 210'           |      | 94  | 126 | 97  | 113 | 105 | 125 | 109 | 119 |
| 240'           |      | 100 | 123 | 102 | 119 | 109 | 119 | 101 | 123 |

### Statistische Auswertung der Versuchsergebnisse

Die statistische Auswertung wurde getrennt für die Farbstoff- und für die Farbstoff-Hyaluronidase-Quaddeln durchgeführt. Mit Hilfe von mehrfachen Varianz-Analysen wurde zunächst geprüft, ob sich im zeitlichen Verhalten der einzelnen Quaddeltypen statistisch faßbare Unterschiede manifestieren. Zur Prüfung der Frage, zu welchen Zeitpunkten speziell eine statistisch gesicherte Abweichung von der zugehörigen Kontroll-Quaddel auftritt, wurde ein mehrfacher Vergleich der Versuchszeiten mit der Kontroll-Quaddel durchgeführt (12). Hierzu wurde die kleinste Abweichung  $d_K$  von der Kontroll-Quaddel ermittelt, die einer statistisch auf dem 5 %-Niveau gesicherten Hemmung entspricht.

Die Varianz-Analysen sind in den Tabellen 6 bis 10 zusammengestellt. In diesen Tabellen ist außerdem die kleinste, statistisch noch gesicherte Abweichung  $d_K$  von der Kontrolle angegeben. Die beobachteten arithmetischen Mittel zu den einzelnen Versuchszeiten und die zugehörigen Abweichungen von den Kontrollen sind in den Tabellen 11 bis 15 aufgeführt. Schließlich wurden in den Abbildungen 1 bis 5 die Verläufe der beobachteten Abweichungen von den Kontrollen dargestellt. Die in diesen Abbildungen eingezeichnete strichpunktierte Linie entspricht der kleinsten, statistisch gesicherten Abweichung vom Kontrollwert.

Im einzelnen führte die statistische Auswertung zu folgenden Ergebnissen:

Versuchsreihe 1 (R 1802):

Sowohl für die reine Farbstoff-Quaddel als auch für die Farbstoffhyaluronidase-Quaddel liegen statistisch gesicherte Hemmungen des Spreading vor. Hinsichtlich der Größe dieser Hemmungen unterscheiden sich die beiden Quaddel-Typen in statistisch gesicherter Weise. Das Maximum der Hemmung tritt für die Farbstoffhyaluronidase-Quaddel zum Zeitpunkt 150' ein.

Versuchsreihe 2 (R 2070):

Es liegt sowohl für die reine Farbstoff-Quaddel als auch für die Farbstoffhyaluronidase-Quaddel zu den Versuchszeiten eine statistisch gesicherte Hemmung des Spreading vor. Das Maximum dieser Hemmung wird für beide Quaddel-Typen zum Zeitpunkt 120' erreicht. In der Größe der Hemmung unterscheidet sich jedoch die Farbstoffhyaluronidase-Quaddel in statistisch gesicherter Weise von der Farbstoff-Quaddel.

Versuchsreihe 3 (R 2131):

Es liegt für beide Quaddel-Typen eine statistisch gesicherte Hemmung des Spreading zu den Versuchszeiten vor. Für die Farbstoff-Quaddel wird das Maximum dieser Hemmung zum Zeitpunkt 60',

für die Farbstoffhyaluronidase-Quaddel zum Zeitpunkt 90' erreicht. Hinsichtlich der Größe der erzielten Hemmung unterscheidet sich die Farbstoffhyaluronidase-Quaddel in statistisch gesicherter Weise von der Farbstoff-Quaddel.

#### Versuchsreihe 4 (R 2189):

Eine statistisch gesicherte Hemmung des Spreading liegt hier nur für die Farbstoffhyaluronidase-Quaddel vor. Die reine Farbstoff-Quaddel zeigt dagegen zum Zeitpunkt 240' eine statistisch gesicherte Vergrößerung des Spreading. Für die Farbstoffhyaluronidase-Quaddel tritt das Maximum der Hemmung zum Zeitpunkt 90' ein. Hinsichtlich der Größe der beobachteten Effekte unterscheiden sich die beiden Quaddel-Typen in statistisch gesicherter Weise.

#### Versuchsreihe 5 (Placebo):

Es liegen weder für die reine Farbstoff-Quaddel noch für die Farbstoffhyaluronidase-Quaddel statistisch faßbare Abweichungen von den Kontrollwerten vor. Ein Einfluß der Salbengrundlage auf das Farbstoffhyaluronidase-Spreading kann somit ausgeschlossen werden.

#### Vergleich der 4 Salben

Die drei 5 %igen Zubereitungen unterscheiden sich in statistisch

gesicherter Weise sowohl hinsichtlich des Verhaltens der reinen Farbstoff-Quaddel als auch desjenigen der Farbstoff-hyaluronidase-Quaddel. Dabei liegen zwischen den beiden Zubereitungen R 2131 und R 2189 keine statistisch faßbaren Unterschiede vor; diese beiden Zubereitungen unterscheiden sich jedoch statistisch gesichert von R 2070. Bei annähernd gleicher maximaler Hemmung der Farbstoffhyaluronidase-Quaddel tritt diese bei R 2070 zu einem späteren Zeitpunkt (120') auf als bei den zwei anderen Formen (90').

Hinsichtlich des Verhaltens der Farbstoff-Quaddel zeigt R 2070 eine deutlich stärkere Hemmung als die beiden anderen 5 %igen Zubereitungsformen.

Die 20 %ige Zubereitungsform, R 1802, unterscheidet sich in statistisch gesicherter Weise nur von R 2131 und R 2189; gegenüber R 2070 liegt dagegen im Verhalten der Farbstoff-hyaluronidase-Quaddel kein statistisch faßbarer Unterschied vor. Das Maximum der Hemmung der Farbstoffhyaluronidase-Quaddel ist allerdings bei R 1802 etwas größer und tritt auch etwas später ein als bei R 2070. Die bei R 2070 beobachtete stärkere Hemmung der reinen Farbstoff-Quaddel liegt bei R 1802 allerdings nicht vor.

Der Vergleich zwischen den verschiedenen Zubereitungsformen erfolgte mit Hilfe mehrfacher Varianz-Analysen, deren Ergebnisse in den Tabellen 16 und 17 wiedergegeben sind.

Zeichenerklärung zu den Tabellen 6 - 17

- Zeit = Zeit in Minuten nach Auftragen der Salbe
- F = Farbstoffquaddel ohne Hyaluronidase
- FH = Farbstoffquaddel mit Hyaluronidase
- L = Leerversuch vor Auftragen der Salbe
- n = die Zahl der Freiheitsgrade der Varianz-Komponente
- SAQ = das Summen-AbstandsQuadrat der Varianz-Komponente
- MAQ = das Mittlere-Abstands-Quadrat der Varianz-Komponente
- F<sub>emp.</sub> = der Varianz-Quotient zwischen der jeweiligen Varianz-Komponente und der experimentellen Variabilität (Rest-Varianz)
- p = die Überschreitungswahrscheinlichkeit des Varianz-Quotienten F<sub>emp.</sub> in der zugehörigen F-Prüfverteilung
- d<sub>K</sub> = kleinste, statistisch noch gesicherte Abweichung von der Kontrollquaddel
- $\bar{x}$  = Fläche der Quaddeln in mm<sup>2</sup> der Mittelwerte
- D = Differenz zur Leerversuchsquaddel in mm<sup>2</sup> der Mittelwerte

Tabelle 6  
(Versuchsreihe 1)

R 1802

Farbstoff-Quaddel

| Varianz-Komponente | n  | SAQ     | MAQ    | F <sub>emp</sub> | p     |
|--------------------|----|---------|--------|------------------|-------|
| Zwischen Probanden | 3  | 1144,08 | 381,36 | 52,38            | 0,1 % |
| Zwischen Zeiten    | 8  | 290,00  | 36,25  | 4,98             | 0,1 % |
| Rest-Varianz       | 24 | 174,67  | 7,28   |                  |       |
| Gesamt-Varianz     | 35 | 1608,75 | 54,96  |                  |       |

$$d_K = 4,73$$

Farbstoffhyaluronidase-Quaddel

| Varianz-Komponente | n  | SAQ      | MAQ     | F <sub>emp</sub> | p     |
|--------------------|----|----------|---------|------------------|-------|
| Zwischen Probanden | 3  | 171,42   | 57,14   | 1,02             | -     |
| Zwischen Zeiten    | 8  | 11810,50 | 1476,31 | 26,39            | 0,1 % |
| Rest-Varianz       | 24 | 1342,83  | 55,95   |                  |       |
| Gesamt-Varianz     | 35 | 13324,75 | 380,71  |                  |       |

$$d_K = 13,12$$

Tabelle 7  
(Versuchsreihe 2)

R 2070

Farbstoff-Quaddel

| Varianz-Komponente | n  | SAQ     | MAQ    | F <sub>emp</sub> | p     |
|--------------------|----|---------|--------|------------------|-------|
| Zwischen Probanden | 3  | 978,89  | 326,30 | 12,59            | 0,1 % |
| Zwischen-Zeiten    | 8  | 2249,00 | 281,13 | 10,85            | 0,1 % |
| Rest-Varianz       | 24 | 622,11  | 25,92  |                  |       |
| Gesamt-Varianz     | 35 | 3850,00 | 110,00 |                  |       |

$$d_K = 8,98$$

Farbstoffhyaluronidase-Quaddel

| Varianz-Komponente | n  | SAQ      | MAQ     | F <sub>emp</sub> | p     |
|--------------------|----|----------|---------|------------------|-------|
| Zwischen Probanden | 3  | 2196,56  | 732,19  | 15,15            | 0,1 % |
| Zwischen Zeiten    | 8  | 9424,72  | 1178,09 | 24,38            | 0,1 % |
| Rest-Varianz       | 24 | 1159,94  | 48,33   |                  |       |
| Gesamt-Varianz     | 35 | 12781,22 | 365,18  |                  |       |

$$d_K = 12,19$$

Tabelle 8  
(Versuchsreihe 3)

R 2131

Farbstoff-Quaddel

| Varianz-Komponente | n  | SAQ     | MAQ    | F <sub>emp</sub> | p     |
|--------------------|----|---------|--------|------------------|-------|
| Zwischen Probanden | 3  | 1266,08 | 422,03 | 16,33            | 0,1 % |
| Zwischen Zeiten    | 8  | 652,72  | 81,59  | 3,16             | 2,0 % |
| Rest-Varianz       | 24 | 620,17  | 25,84  |                  |       |
| Gesamt-Varianz     | 35 | 2538,97 | 72,54  |                  |       |

$$d_K = 8,91$$

Farbstoffhyaluronidase-Quaddel

| Varianz-Komponente | n  | SAQ      | MAQ    | F <sub>emp</sub> | p     |
|--------------------|----|----------|--------|------------------|-------|
| Zwischen Probanden | 3  | 1493,67  | 497,89 | 9,31             | 0,1 % |
| Zwischen Zeiten    | 8  | 7288,39  | 911,05 | 17,03            | 0,1 % |
| Rest-Varianz       | 24 | 1283,83  | 53,49  |                  |       |
| Gesamt-Varianz     | 35 | 10065,89 | 287,60 |                  |       |

$$d_K = 12,83$$

Tabelle 9  
(Versuchsreihe 4)

R 2189

Farbstoff-Quaddel

| Varianz-Komponente | n  | SAQ     | MAQ    | F <sub>emp</sub> | p     |
|--------------------|----|---------|--------|------------------|-------|
| Zwischen Probanden | 3  | 976,11  | 325,37 | 14,48            | 0,1 % |
| Zwischen Zeiten    | 8  | 1096,39 | 137,04 | 6,10             | 0,1 % |
| Rest-Varianz       | 24 | 539,39  | 22,47  |                  |       |
| Gesamt-Varianz     | 35 | 2611,89 | 74,62  |                  |       |

$$d_K = 8,31$$

Farbstoffhyaluronidase-Quaddel

| Varianz-Komponente | n  | SAQ      | MAQ     | F <sub>emp</sub> | p     |
|--------------------|----|----------|---------|------------------|-------|
| Zwischen Probanden | 3  | 1010,44  | 336,81  | 3,55             | 5,0 % |
| Zwischen Zeiten    | 8  | 10330,56 | 1291,32 | 13,61            | 0,1 % |
| Rest-Varianz       | 24 | 2276,56  | 94,86   |                  |       |
| Gesamt-Varianz     | 35 | 13617,56 | 389,07  |                  |       |

$$d_K = 17,08$$

Tabelle 10

(Versuchsreihe 5)

Placebo

Farbstoff-Quaddel

| Varianz-Komponente | n  | SAQ     | MAQ    | F <sub>emp</sub> | p     |
|--------------------|----|---------|--------|------------------|-------|
| Zwischen Probanden | 3  | 900,75  | 300,25 | 32,99            | 0,1 % |
| Zwischen Zeiten    | 8  | 157,50  | 19,69  | 2,16             |       |
| Rest-Varianz       | 24 | 218,50  | 9,10   |                  |       |
| Gesamt-Varianz     | 35 | 1276,75 | 36,48  |                  |       |

$$d_K = 5,29$$

Farbstoffhyaluronidase-Quaddel

| Varianz-Komponente | n  | SAQ    | MAQ    | F <sub>emp</sub> | p     |
|--------------------|----|--------|--------|------------------|-------|
| Zwischen Probanden | 3  | 450,31 | 150,10 | 10,02            | 0,1 % |
| Zwischen Zeiten    | 8  | 180,56 | 22,57  | 1,51             |       |
| Rest-Varianz       | 24 | 359,44 | 14,98  |                  |       |
| Gesamt-Varianz     | 35 | 990,31 | 28,29  |                  |       |

$$d_K = 6,79$$

Tabelle 11

(Versuchsreihe 1)

R 1802

| Zeit | F         |    | FH        |     |
|------|-----------|----|-----------|-----|
|      | $\bar{x}$ | D  | $\bar{x}$ | D   |
| L    | 99        |    | 116       |     |
| 30'  | 96        | -3 | 86        | -30 |
| 60'  | 95        | -4 | 77        | -39 |
| 90'  | 92        | -7 | 69        | -47 |
| 120' | 95        | -4 | 59        | -57 |
| 150' | 92        | -7 | 56        | -60 |
| 180' | 94        | -5 | 76        | -40 |
| 210' | 96        | -3 | 82        | -34 |
| 240' | 101       | +2 | 102       | -14 |

Tabelle 12

(Versuchsreihe 2)

R 2070

| Zeit | F         |     | FH        |     |
|------|-----------|-----|-----------|-----|
|      | $\bar{x}$ | D   | $\bar{x}$ | D   |
| L    | 112       |     | 122       |     |
| 30'  | 107       | -5  | 105       | -17 |
| 60'  | 103       | -9  | 87        | -35 |
| 90'  | 93        | -19 | 86        | -36 |
| 120' | 87        | -25 | 71        | -51 |
| 150' | 95        | -17 | 72        | -50 |
| 180' | 98        | -14 | 81        | -41 |
| 210' | 102       | -10 | 90        | -32 |
| 240' | 111       | -1  | 108       | -14 |

Tabelle 13

(Versuchsreihe 3)

R 2131

| Zeit | F         |     | FH        |     |
|------|-----------|-----|-----------|-----|
|      | $\bar{x}$ | D   | $\bar{x}$ | D   |
| L    | 113       |     | 135       |     |
| 30'  | 107       | -6  | 112       | -23 |
| 60'  | 101       | -12 | 102       | -33 |
| 90'  | 104       | -9  | 88        | -47 |
| 120' | 108       | -5  | 96        | -39 |
| 150' | 110       | -3  | 99        | -36 |
| 180' | 113       | 0   | 107       | -28 |
| 210' | 112       | -1  | 116       | -19 |
| 240' | 115       | +2  | 127       | -8  |

Tabelle 14

(Versuchsreihe 4)

R 2189

| Zeit | F         |     | FH        |     |
|------|-----------|-----|-----------|-----|
|      | $\bar{x}$ | D   | $\bar{x}$ | D   |
| L    | 127       |     | 143       |     |
| 30'  | 124       | -3  | 126       | -17 |
| 60'  | 121       | -6  | 114       | -29 |
| 90'  | 122       | -5  | 91        | -52 |
| 120' | 120       | -7  | 93        | -50 |
| 150' | 126       | -1  | 104       | -39 |
| 180' | 127       | 0   | 118       | -25 |
| 210' | 130       | +3  | 127       | -16 |
| 240' | 139       | +12 | 136       | -7  |

Tabelle 15  
(Versuchsreihe 5)

Placebo

| Zeit | F         |    | FH        |    |
|------|-----------|----|-----------|----|
|      | $\bar{x}$ | D  | $\bar{x}$ | D  |
| L    | 102       |    | 125       |    |
| 30'  | 98        | -4 | 123       | -2 |
| 60'  | 106       | +4 | 124       | -1 |
| 90'  | 102       | 0  | 120       | -5 |
| 120' | 103       | +1 | 119       | -6 |
| 150' | 104       | +2 | 118       | -7 |
| 180' | 101       | -1 | 121       | -4 |
| 210' | 101       | -1 | 121       | -4 |
| 240' | 103       | +1 | 121       | -4 |

Tabelle 16  
Farbstoff-Quaddel

| Varianz-Komponente                            | n   | SAQ      | MAQ     | F <sub>emp</sub> | p     |
|-----------------------------------------------|-----|----------|---------|------------------|-------|
| Zwischen Probanden<br>(Substanzen)            | 12  | 4365,16  | 363,76  | 17,85            | 0,1 % |
| Zwischen Zeiten<br>(Gesamt)                   | 8   | 2726,50  | 340,81  | 16,72            | 0,1 % |
| Zwischen 5 %igen<br>Substanzen                | 2   | 11952,06 | 5976,03 | 100,00           | 0,1 % |
| Zwischen 20 %igen und<br>5 %igen Substanzen   | 1   | 7301,33  | 7301,33 | 100,00           | 0,1 % |
| Parallelität 5 %ige<br>Substanzen             | 16  | 1295,61  | 80,98   | 3,97             | 0,1 % |
| Parallelität 20 %ige<br>und 5 %ige Substanzen | 8   | 266,00   | 33,25   | 1,63             | -     |
| Rest-Varianz<br>(Substanz)                    | 96  | 1956,34  | 20,38   |                  |       |
| Gesamt-Varianz                                | 143 | 29863,00 | 208,83  |                  |       |

Tabelle 17

Farbstoffhyaluronidase-Quaddel

| Varianz-Komponente                            | n   | SAQ      | MAQ      | F <sub>emp</sub> | p     |
|-----------------------------------------------|-----|----------|----------|------------------|-------|
| Zwischen Probanden<br>(Substanzen)            | 12  | 4872,09  | 406,01   | 6,43             | -     |
| Zwischen Zeiten<br>(Gesamt)                   | 8   | 35995,47 | 4499,43  | 71,24            | 0,1 % |
| Zwischen 5 %igen<br>Substanzen                | 2   | 12373,85 | 6186,93  | 97,96            | 0,1 % |
| Zwischen 20 %igen und<br>5 %igen Substanzen   | 1   | 17722,89 | 17722,89 | 100,00           | 0,1 % |
| Parallelität 5 %ige<br>Substanzen             | 16  | 2135,82  | 133,49   | 2,11             | 1,0 % |
| Parallelität 20 %ige<br>und 5 %ige Substanzen | 8   | 722,88   | 90,36    | 1,43             | -     |
| Rest-Varianz<br>(Substanz)                    | 96  | 6063,16  | 63,16    |                  |       |
| Gesamt-Varianz                                | 143 | 79886,16 | 558,64   |                  |       |

### Erklärung zu den Abbildungen

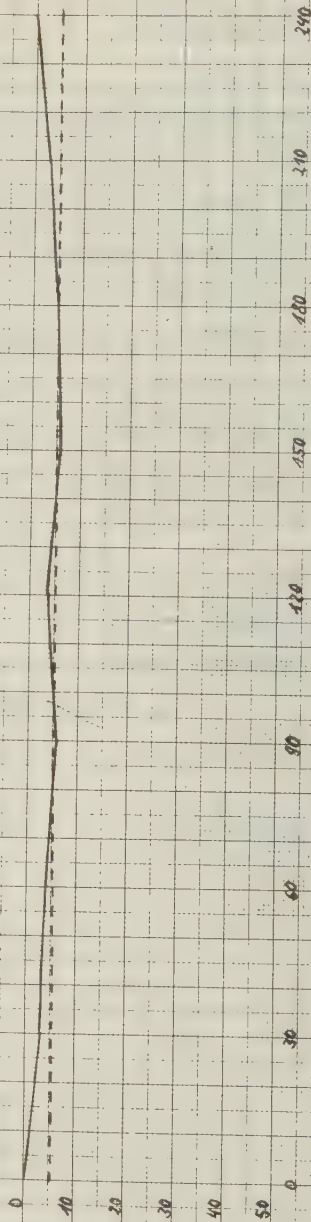
Die Abbildungen zeigen die grafische Darstellung der Hemmung der Farbstoff- und Farbstoffhyaluronidase-Quaddeln jeder Versuchsreihe in ihren Mittelwerten. Die Mittelwerte stellen das arithmetische Mittel aller Quaddelflächen einer Zeit in einer Versuchsreihe dar. Auf der Koordinate sind die Differenzen der Mittelwerte in  $\text{mm}^2$  der Quaddeln vom Ausgangsmittelwert der Leerversuchsquaddel eingezeichnet, auf der Abszisse die Versuchszeiten. Die strichpunktierte Linie entspricht der kleinsten, statistisch gesicherten Abweichung vom Kontrollwert.

F = Farbstoff-Quaddel ohne Hyaluronidase

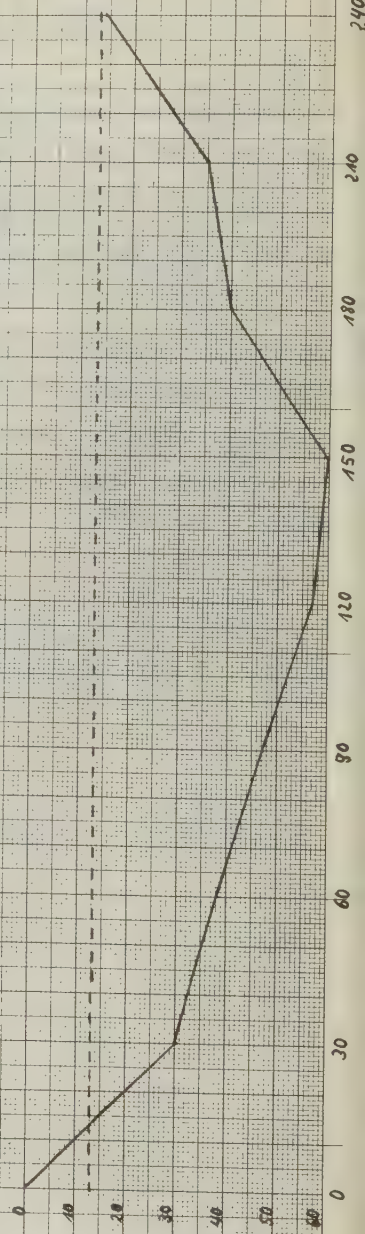
FH = Farbstoff-Quaddel mit Hyaluronidase

Abb. 1 R 1802

F

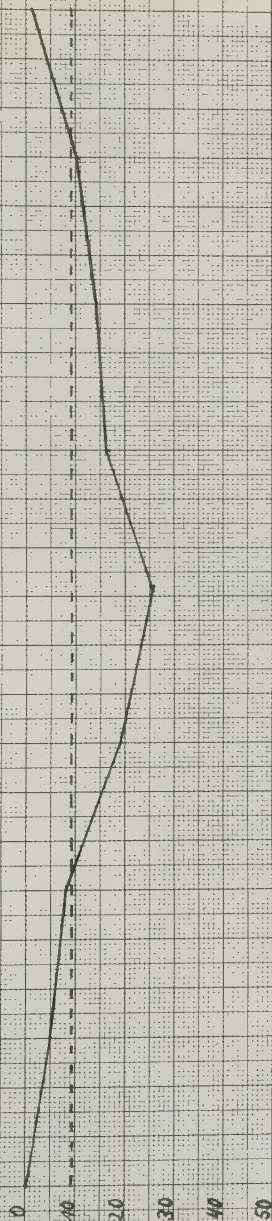


FH



# Abb.2 R2070

F



FH

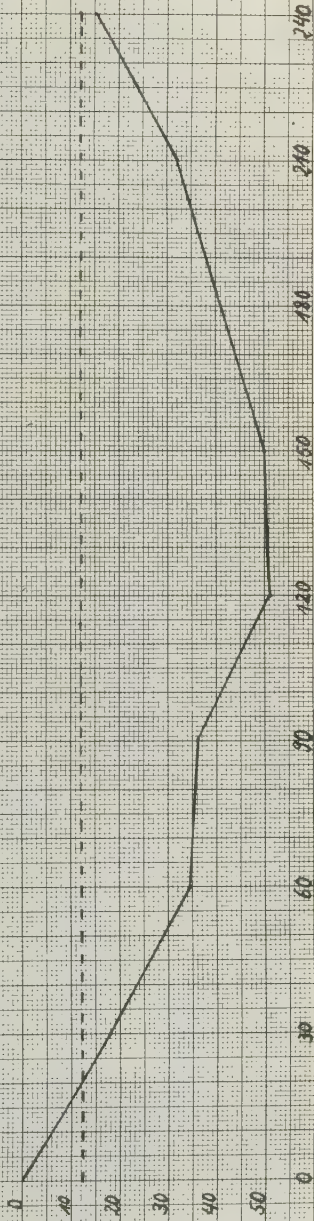
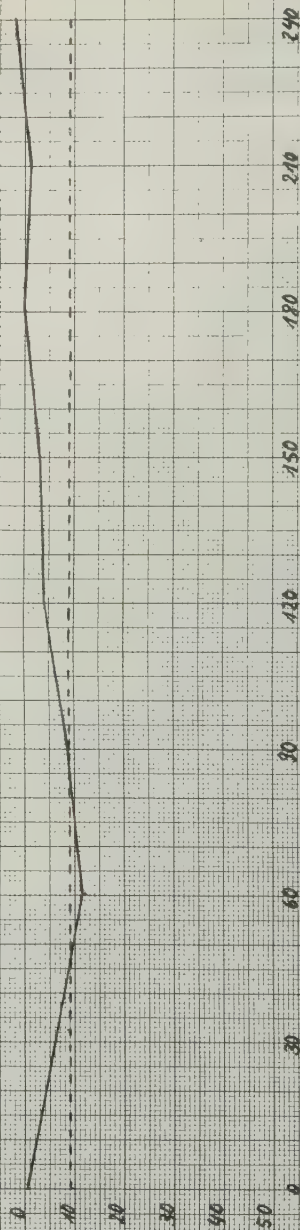


Abb. 3 R 2131

F



FH

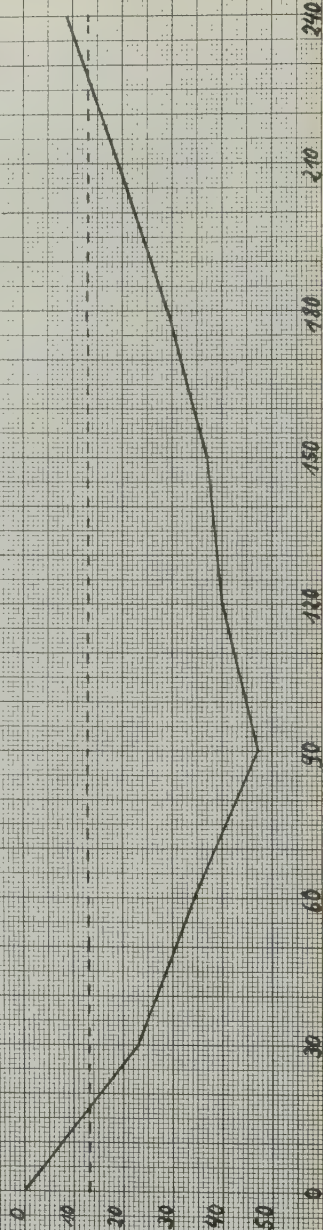
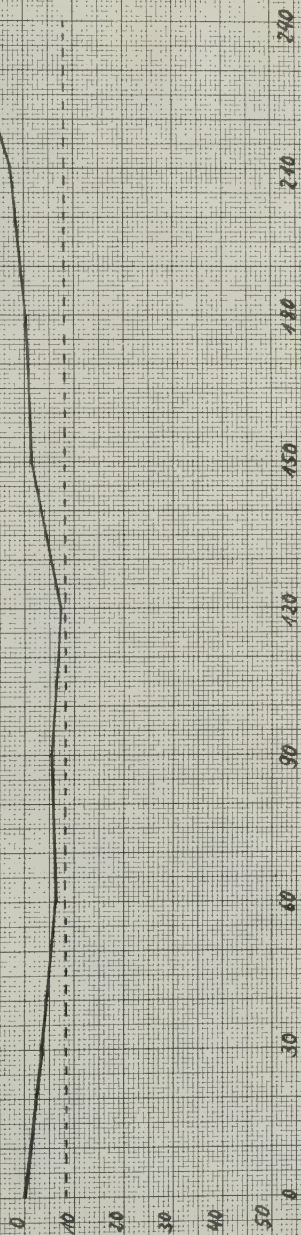
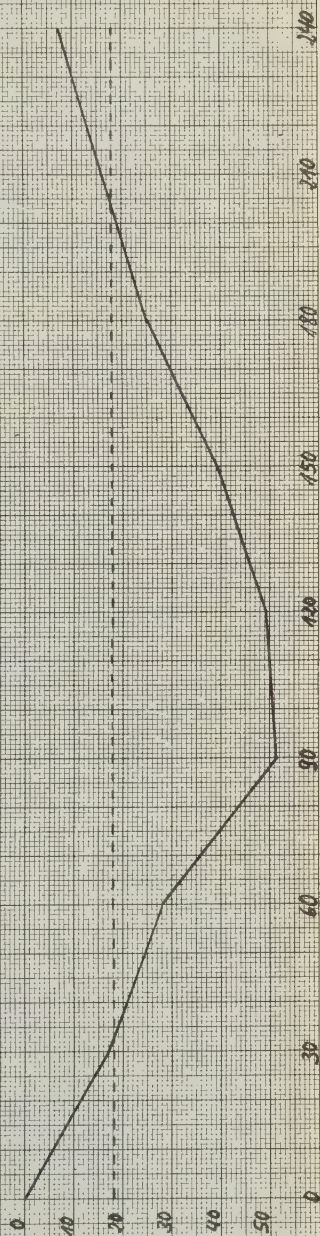


Abb. 4 R 2189

F

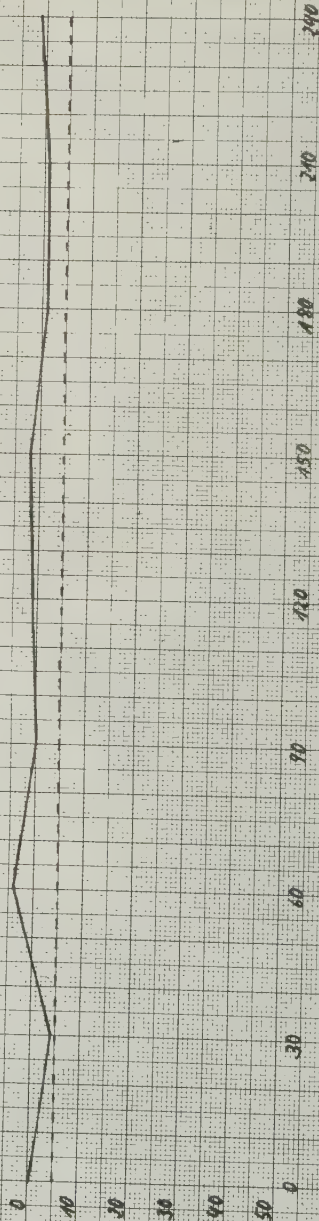


FH

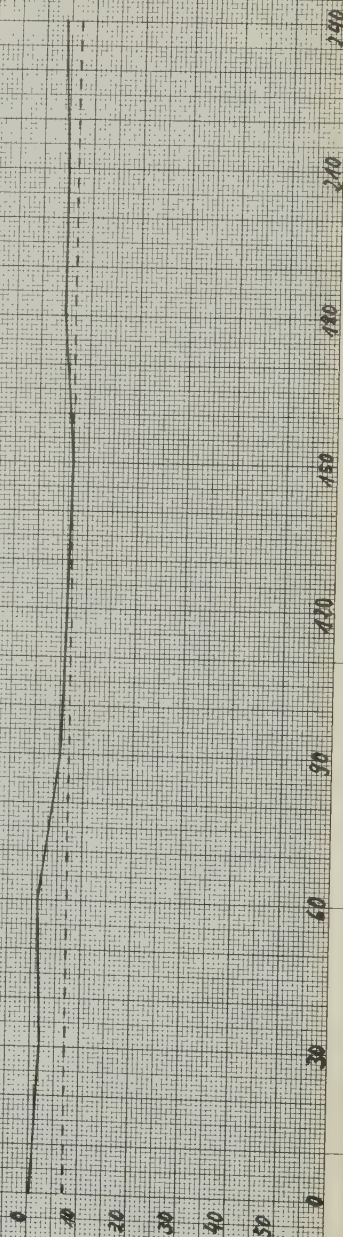


# Abb. 5 Placebo

F



FH



### Diskussion

Mit der eingangs ausführlich beschriebenen Versuchsanordnung wurde eine statistisch signifikante Hemmung des Hyaluronidase-Spreading bei Verabreichung aller untersuchten Butazolidin-Salben nachgewiesen. Durch die Versuchsergebnisse wird eine percutane Resorption von Butazolidin nach Applikation in Salbenform bewiesen. Der hemmende Einfluß auf das Hyaluronidase-Spreading konnte an der Bauchhaut des Menschen nach Einreiben der Brust- und seitlichen Thoraxhaut sowie der oberen und unteren Extremitäten mit verschiedenen prozentigen Butazolidin-Salben gezeigt werden. Eine lokale Wirkung durch intracutane Ausbreitung des Wirkstoffes von den Auftrags- zu den Meßstellen ist bei der räumlichen Differenz zwischen diesen nicht anzunehmen, wenn auch die operative Trennung nicht wie im Tierversuch möglich war. Demnach kann mit einer Allgemeinwirkung höherer Dosen nach erfolgter Resorption gerechnet werden.

Die Vergleichsversuche mit Salbengrundlage sichern die Wirkung der Prüfsubstanzen selbst gegenüber Einflüssen der Versuchsm Manipulation und zeigen die Fehlerbreite der Methodik.

Im Gegensatz zu den eingangs erwähnten Versuchen von M a t h i e s (13) am Menschen, wobei nach Applikation von Butazolidin-Salben in niedriger Dosis von nur 1,66 mg Wirksubstanz pro kg/Kg keine signifikante Hemmung des Farbstoff-Spreading nachgewiesen werden konnte, haben in den von mir durchgeführten Ver-

suchen höhere Dosen der Wirksubstanz beim Menschen deutliche Wirkungen gezeigt. Auffallend dabei ist, daß die Differenz zwischen Farbstoff- und Farbstoffhyaluronidase-Quaddel bei dem verwendeten Farbstoff relativ gering ist. Die Hemmung der reinen Farbstoff-Quaddel ohne Hyaluronidase-Beigabe nach Applikation der Wirksubstanz kann als Einwirkung auf die Gewebshyaluronidase oder als hyaluronidaseunabhängiger permeabilitätshemmender Effekt gedeutet werden, zumal man dieses Phänomen bei intraperitonealer Verabreichung von Butazolidin in höheren Dosen auch im Tierversuch beobachtet hat.

Wie schon erwähnt, läßt sich im Menschenversuch wegen der monatelangen Verweildauer in der Haut das bei den Tierversuchen angewandte Evans-Blau nicht verwenden. Die Farbtintensität des Patentblau VF bei 0,1 %iger Verdünnung ist geringer als die der in den Tierversuchen verwandte 0,06 %ige Evans-Blau-Lösung, jedoch ist eine stärkere Patentblau-Konzentration als eine 0,1 %ige Lösung wegen Schmerzhaftigkeit nicht anwendbar. Wir glauben, daß wegen der geringeren Farbtintensität die sichtbare Farbausbreitung bei Hyaluronidase-Beigabe eine geringere ist. Auffällig ist jedoch, daß nach Einwirkung hyaluronidasehemmender Substanzen, wie auch hier im Falle der Butazolidin-Salbe, die Farbstoffausbreitung der Farbstoffhyaluronidase-Quaddel geringer wird als die der Farbstoff-Quaddel. Eine stichhaltige Erklärung für dieses bei allen Versuchspersonen konstante Verhalten konnte bisher nicht gefunden werden. Es kommt jedoch bei allen Versuchen mit Butazolidin-Salbe

zu einer deutlichen Hemmung der Farbstoffausbreitung bei der Farbstoffhyaluronidase-Quaddel, die bei der Salbengrundlage nicht auftritt und demnach als Beweis für die Phenylbutazon-Wirkung angesehen werden kann.

Bei Betrachtung der in der Abb. 1 eingezeichneten Werte fällt auf, daß die stärkste Hemmung durch das Präparat R 1802 (20 %ig) erzielt wird. Die Versuchspräparate R 2070, R 2131 und R 2189 (5 %ig) unterscheiden sich in erster Linie durch die zu verschiedenen Zeiten beobachteten Maximalwerte. So liegt die stärkste jeweilige Hemmung bei den Präparaten R 2131 und R 2189 bereits 90' post applicationem vor, während die bei R 2070 (wie auch bei der 20 %igen Zubereitung R 1802) bei 120' post applicationem liegt. Von der Betrachtung der Maximalwerte ausgehend, zeigt das Versuchspräparat R 2131 die schwächste Wirksamkeit. Die statistische Auswertung gibt Auskunft darüber, inwieweit die Wirkungen und Wirkungsunterschiede der einzelnen Salben gesichert sind. Auffällig ist ferner die relativ starke Hemmung der Farbstoffausbreitung der reinen Farbstoff-Quaddel nach Applikation der Salbe R 2070. Wir kennen Substanzen mit solchem Effekt, der als Hemmung der gewebseigenen Hyaluronidase oder als hyaluronidaseunabhängiger permeabilitätshemmender Effekt gedeutet wurde. Es ist jedoch nicht ohne weiteres erklärbar, weshalb hier die gleiche Substanz in 5 %iger Salbe diesen Effekt aufweist, während sie bei 20 %iger Konzentration nicht diese Wirkung auf die reine Farbstoff-Quaddel besitzt. Es handelt sich bei R 2070 jedoch um einen bei allen Versuchspersonen

zu beobachtenden Effekt.

Wesentlich an den Untersuchungen erscheint das Ergebnis, daß Phenylbutazon als Salbe appliziert auch beim Menschen resorbiert zu werden scheint. Die für eine Allgemeinwirkung, deren Erzielung im Rahmen der Versuchsanordnung notwendig ist, erforderliche hohe Dosis, die nur durch Einreiben größerer Körperbezirke erreicht werden kann, besagt nicht, daß lokale Wirkungen bereits mit entsprechend niedrigeren Dosen erzielt werden können.

### Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß Butazolidin-Salben in verschiedener Zubereitung durch die menschliche Haut resorbiert werden können. Als Grundlage für die Untersuchungen diente die Tatsache, daß Phenylbutazon hemmend auf die Hyaluronidase-Aktivität einwirkt. Die Hemmung wurde mit dem sogenannten Spreading-Test am Menschen bestimmt. Da Auftragungsort und Meßstellen räumlich genügend weit voneinander getrennt waren, ist eine Allgemeinwirkung der Salbenapplikation anzunehmen, die eine erfolgte Resorption durch die Haut beweist.



12. Dunnet, C. W.: J. am. statist. assoc. 50,  
1096 (1955)
13. Mathies, H.: Arzneimittelforsch. 9,  
805 (1963)

Herrn Prof. S e i t z danke ich für die Überlassung des  
Themas. Herrn Dr. M a t h i e s danke ich für die Anre-  
gung zu dieser Arbeit und für die erwiesene Unterstützung.  
Herrn Dipl. Math. K. L i e b r i c h sage ich Dank für die  
Durchführung der statistischen Berechnungen.

### Lebenslauf

Am 3. Juli 1937 wurde ich als zweiter Sohn des praktischen Arztes Dr. med. Anton Brusis und seiner Ehefrau Erika, geb. Hippeli, in München geboren. Nach kurzen Aufenthalten in Bayreuth und München zogen wir 1939 nach Altötting. Dort besuchte ich von 1943 bis 1947 die Volksschule. 1947 kam ich an das Humanistische Gymnasium Ettal, wo ich 1956 im Juli absolvierte. Im Wintersemester 1956/57 begann ich an der Universität Würzburg mein medizinisches Studium, im Wintersemester 1957/58 studierte ich in Innsbruck, von dort ging ich wieder nach Würzburg zurück, wo ich im Wintersemester 1958/59 mein ärztliches Vorexamen bestand. Anschließend studierte ich jeweils ein Semester in Würzburg, Innsbruck, Wien, München und Berlin. Von Berlin kehrte ich nach München zurück und beendete das Medizinstudium am 2. August 1962 mit der Ablegung der ärztlichen Prüfung. Von August 1962 bis November 1962 war ich als Medizinalassistent in der Praxis meines Vaters tätig. Anschließend daran war ich zwei Monate an der Universitätskinderklinik München. Seit Januar 1963 arbeite ich als Medizinalassistent im Kreiskrankenhaus München-Pasing. Seit September 1962 bin ich verheiratet.





